



## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **08027021 A**(43) Date of publication of application: **30.01.96**

(51) Int. Cl.

**A61K 38/00****A61K 38/00****A61K 38/00****A61K 38/00**(21) Application number: **06171377**(22) Date of filing: **22.07.94**(71) Applicant: **MITSUI TOATSU CHEM INC  
MURAMATSU TAKASHI**(72) Inventor: **MURAMATSU TAKASHI  
MURAMATSU TOSHIKO  
AWAYA AKIRA  
SAKAKIBARA SHUNPEI  
KIMURA AKITOSHI**(54) **MEDICINAL COMPOSITION**

(57) Abstract:

PURPOSE: To obtain a new medicinal composition applicable to vascular lesions, diseases in the vascular systems, etc.

CONSTITUTION: This preventing or therapeutic agent for cardiac infarction, thrombosis, angiostenosis, bloodstream insufficiency, arteriosclerosis, etc., contains a polypeptide belonging to the family midkine (MK) or its fragment peptide or a variant, having the physiological activities similar to those and homologous therewith or an analog thereof as an active ingredient. The compound which is an active ingredient has actions on enhancement of the production of a plasminogen activator at both an mRNA level and a protein activity level. The effective daily dose thereof is within the range of 0.001-50mg/kg as a

bolus once or several times or continuously administered by drip infusion, etc. Human MK comprising 121 amino acids or a pleiotrophin polypeptide having 50% amino acid homology with the MK is cited as the polypeptide belonging to the MK family.

COPYRIGHT: (C)1996,JPO

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-27021

(43) 公開日 平成8年(1996)1月30日

(51) Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 38/00	ACB			
	ABR			
	ABS			

A 6 1 K 37/ 02

ACB

ABR

審査請求 未請求 請求項の数 3 O L (全 10 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平6-171377

(22) 出願日 平成6年(1994)7月22日

(71) 出願人 000003126

三井東圧化学株式会社

東京都千代田区霞が関三丁目2番5号

(71) 出願人 591038945

村松 喬

愛知県名古屋市天白区天白町大字島田字黒

石3785-3391 シティコーポしまだ B-205

(72) 発明者 村松 喬

愛知県名古屋市天白区天白町大字島田字黒

石3785-3391 シティコーポしまだ B-205

(74) 代理人 弁理士 若林 忠

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 医薬組成物

(57) 【要約】

【目的】 血管系疾患に適用される新規な医薬組成物。

【構成】 ミッドカインファミリーに属するポリペプチドあるいはその断片ペプチド等を有効成分とする。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 ミッドカイン (MK) ファミリーに属するポリペプチドあるいはその断片ペプチド、又はそれらと同様の生理活性を有するそれらと相同的な変異体またはそれらの類似体を有効成分とする、心筋梗塞、血栓、血管狭窄、血流不全、動脈硬化症等の予防・治療剤。

【請求項2】 請求項1記載のミッドカイン (MK) ファミリーに属するポリペプチドがミッドカイン (MK) ポリペプチドである心筋梗塞、血栓、血管狭窄、血流不全、動脈硬化症等の予防・治療剤。

【請求項3】 請求項1記載のミッドカイン (MK) ファミリーに属するポリペプチドがプレイオトロピン (pleiotrophin) ポリペプチドである心筋梗塞、血栓、血管狭窄、血流不全、動脈硬化症等の予防・治療剤。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は新規な、血管病変、血管系疾患などに対する医薬、診断薬に関するものである。更に詳しくいえば、狭心症、心筋梗塞、脳梗塞、血栓、血管狭窄、血流不全、血小板異常症、播種性血管内凝固症候群、深部静脈血栓症、肺塞栓症、動脈硬化症、経皮的冠動脈再建術 (PTCA) 後の冠動脈再灌流後におこる血管再狭窄・再閉塞、再梗塞などに対する予防・治療剤として期待されるミッドカイン (Midkine, MK) ポリペプチドあるいはその断片ペプチド、又はそれらと同様の生理活性を有するそれらの類似体を有効成分として含む医薬組成物に関するものである。

## 【0002】

【従来の技術】狭心症また急性心筋梗塞などにおける冠動脈血栓に対して、今日ウロキナーゼ (以下u-PA) や組織プラスミノゲンアクチベーター (以下、t-PA) などによる血栓溶解の薬物療法ならびにPTCAが施行されている。

## 【0003】

【発明が解決しようとする課題】急性心筋梗塞の発症後、可能な限り早い時期にt-PAなどを患者に投与して、血栓溶解を行い、梗塞巣の広がりを抑えることにより心筋の壊死を防護することができるが、血栓を溶解するという主たる目的は達成するものの、同時に脳や心臓等の血管からの出血傾向も惹起される。特に、高齢者や血圧の高い患者または糖尿病や腎障害をわずらう患者へのt-PA等の投与は慎重を要する。

【0004】またt-PA治療の有効率は70~80%と言われ、なお20~30%の有効率の向上が期待されており、たとえば血小板過多の患者等における、t-PA単独では効果の出にくい症例においては、抗凝固剤や抗血栓剤の併用投与が試みられている。

【0005】このような血液成分の異常、さらにまた血管における、たとえば各組織部位細胞における血液凝固

一線維素溶解系カスケードに属する各タンパク質の相互作用による調節機構が異常をおこすことにより生ずる血管病変、血管疾患のより効果的な予防・治療のためには、これら調節機構のより深い理解が必須である。

【0006】またt-PA治療の有効率の向上、あるいはPTCA後に発生する、冠動脈再灌流障害である血管の各種傷害による、血管再狭窄・再閉塞、再梗塞など、ヘパリン投与によっては抑制できない晩発障害さらに慢性的な動脈硬化症などの有効な治療のためには、それ自身単独で、血栓溶解作用がある、新たなタンパク質または合成医薬の開発、あるいは生体内におけるt-PAおよびu-PAの生合成を内因的に高めるタンパク質または合成医薬の開発が望まれる。さらにそれらタンパク質や合成医薬が開発された際には、t-PA等と併用することが考えられる。

【0007】このような考察のもとに、本発明者らは生体由来のタンパク質の中に、血液凝固一線維素溶解系カスケードとのかかわりがこれまで知られておらず、実はこの調節機構に深くかかわっているタンパク質があるのではないかと考え、生体由来のタンパク質につき鋭意、検討したところ、本発明者らが既に単離し、遺伝子配列、アミノ酸一次配列を決定した神経栄養因子様活性を有する新規なタンパク質ミッドカイン (MK) (特開平5-91880) が上記のような、生体内におけるt-PAおよびu-PAの生合成を内因的に高める目的に合致した作用を有する、タンパク質であることを発見するに及び、本発明を完成するに至った。

【0008】即ち本発明の目的は、MKポリペプチドあるいはその断片ペプチド又はそれらと同様の生理活性を有するそれらの類似体を有効成分とする、心筋梗塞、血栓、血管狭窄、血流不全、動脈硬化症等の予防・治療剤を提供することである。

## 【0009】

【課題を解決するための手段】本発明者らは先に、レチノイン酸支配下において、細胞の分化・増殖をコントロールする因子として、マウス由来MKポリペプチド (Kadomatsu, K., et al.: Biochem. Biophys. Res. Commun. (BBRC), 151, 1312 (1988) およびTomomura, M., et al.: J. Biol. Chem., 265, 10765 (1990)) およびヒト由来MKポリペプチド (特開平5-91880) を見出ししてきた。

【0010】そしてMKが神経細胞の生存および神経突起伸長の2つの活性を持つ神経栄養因子であること、またMKが発癌、アルツハイマー病発症とのかかわりがあることがその後の研究により明らかにされた (村松 喬: レチノイン酸応答性のヘパリン結合性成長因子、ミッドカイン (MK) -発生分化、がん、神経とのかかわりで-; 生化学第65巻第12号、1494~1504

頁、1993年12月。特開平6-172218)。

【0011】またMKに引き続いてMKと50%のアミノ酸相同性を有するheparinbinding growth associated molecule (HB-GAM) (Merenmies, J. & Rauvala, H. : J. Biol. Chem., 265, 16721-16724, (1990))あるいはプレイオトロピン, pleiotrophin (PTN) (Li, Y. -S., Milner, P. G., Ghauman, A. K., Watson, M. A., Hoffman, R. M., Kodner, C. M., Milbrandt, J., & Deuel, T. F. : Science, 250, 1690-1694, (1990))、またMKと65%のアミノ酸相同性を有するretinoic acid-induced heparin binding protein (RI-HB) (Urios et al., BBRC, 175, 617-624 (1991))と呼ばれる分子が発見され、MKファミリーポリペプチド(蛋白質)に属するものであることが、わかってきた。HB-GAM/PTNは神経突起伸長作用を持つ他、内皮細胞の増殖刺激作用を有することが報告されている(Rauvala, H., EMBO J., 8, 2933-2941 (1989). Wellenstein, A. et al., J. Biol. Chem., 267, 2582-2587 (1992). Courty, J. et al. BBRC, 180, 145-151 (1990))。

【0012】一方、血管内皮細胞が線維素溶解系のまた抗血栓性の各種因子を生産し、これら因子によるカスケードが線溶系の正常な維持を司っていることが明らかにされてきている。血管内皮細胞は、2つの免疫学的に異なるプロテアーゼであるプラスミノゲン活性化因子(アクチベーター)(PA)を生産・放出し、プラスミノゲンをプラスミンに変換する。1つは組織型PA(t-PA)であり、もう1つはウロキナーゼ型PA(u-PA)である(Saksela, O. and Rifkin, D. B., J. Cell Biol., 110, 767-775 (1990). 佐藤 靖史、線溶系の新展開(松尾 理編、学際企画) pp141-153 (1992))。

【0013】このPAの生産にレチノイドが促進的に作用するという報告がある(Inada, Y. et al., BBRC, 130, 182-187 (1985))。即ち、レチノイドが血管内皮細胞に作用すると、PA及び蛋白質間の架橋結合を司る酵素のトランスグルタミナーゼ(Transglutaminase: TGase)の生産を高めること、次いでTGF-β(Transforming growth factor-β)の生産がレチノイド処理により高まること、さらに不活性型分子として生産されるTGF-βの活性

型分子への変換反応(TGF-βの活性化)にPAとTGaseが働くことを明らかにされ、内皮細胞においてレチノイド処理により活性のあるTGF-βが生成してレチノイドのメディエーターとして働いていることが報告されている。

【0014】そこで本発明者らはレチノイン酸によって発現が誘導される遺伝子の産物として発見されたMKあるいはプレイオトロピンなどが、線溶系プロテアーゼであるPAの生産にもなんらかの関与をし、PA生産の制御を行っている可能性が大いにありと想到し、これを明らかにすべく鋭意検討を進めた。

【0015】そして本発明者らの製造したレコンビナントMK、および化学合成MKが、培養血管内皮細胞のPA生産をどう変化させるかを試験したところ、mRNAレベルでも、蛋白活性レベルでも、これらMKがPA生産を増強することが明らかにされ、またPAを阻害する線溶系カスケードの因子であるPA inhibitor (PAI-1)蛋白レベルでもmRNAレベルで抑制することが示された。本発明は上記の考察とこれら知見に基づいて到達したものであり、以下により詳細に記述する。PAの生産をみる血管内皮細胞はウシ大動脈由来内皮細胞やSV-40によりトランスフォームされたウシ内皮細胞などが用いられるが、ヒツジ、ヤギ、ブタ、イヌ、ウサギ、ラット、マウスあるいはヒトの内皮細胞であってもよい。

【0016】上記の試験に供し、また本発明の医薬組成物の有効成分の対象となるMKファミリーに属するポリペプチドあるいはその断片ペプチド、又はそれらと同様の生理活性を有するそれらの類似体としては、121アミノ酸残基よりなるヒトミッドカイン(MK)、MKの断片ペプチドであるN-half (1-59配列)MK、C-half (60-121)MK、C-half (62-104)MK、MKの104-121残基断片ペプチドやその他の、合成中間体断片ペプチド、またプレイオトロピン(PTN)、PTNの断片ペプチドであるN-half (1-66配列)PTN、C-half (67-136)PTN、C-half (67-109)PTNやその他の、合成中間体断片ペプチド、および上記の個々の断片ペプチドと同様の生理活性を有するそれらの類似体があげられる。

【0017】これらポリペプチドあるいは断片ペプチドを、0.1%ウシ血清アルブミン(BSA)含有無血清培地に各濃度に溶かして、コンフルエントの状態の血管内皮細胞を各時間、培養処理した後に、0.5%Triton X-100による細胞抽出液を調製して、そのPA活性レベルを測定すると、ポリペプチドあるいは断片ペプチドの濃度および処理時間に依存してPA活性レベルが上昇することが明らかにされた。

【0018】この細胞抽出液中のPAは、主として細胞表面上に存在するPAであり、PAレベルが亢進するこ

とによって細胞表面上のプラスミンレベルが高まると考えられる。

【0019】そこで別のアッセイ系として、フィブリン膜を用意し、膜上で、内皮細胞を血清添加もしくは0.1%BSA添加無血清培地に培養し、ポリペプチドあるいは断片ペプチドを加えると、フィブリン膜の溶解が細胞表面プラスミンによって起こったが、コントロールの細胞に比べて顕著に溶解が起こることが明らかにされた。

【0020】また細胞表面のプラスミンを抽出し、そのレベルを測定すると、これらポリペプチドあるいは断片ペプチドの添加処理によってプラスミンレベルが高まることが示された。

【0021】またPAおよびPAレセプターのmRNAレベルも、これらポリペプチドあるいは断片ペプチドの添加処理後の内皮細胞では増大していることがわかった。

【0022】他方PAI-1は蛋白レベルでも（たとえば10ng/mlのMK存在下で半減した、mRNAレベルでも減少すること（たとえばU-PAのmRNAレベルが1.5倍になったのに対し、PAI-1のmRNAは40%も減少）が明らかにされ、更にレチノールがU-PAとU-PAレセプターのmRNAレベルのみならず、同時にPAI-1のmRNAレベルも上昇させたことから本発明のポリペプチドあるいは断片ペプチドはPAを選択的に誘導する、臨床的に価値ある特異な因子・薬物であることが認識された。

【0023】またウシ大動脈由来細胞内皮細胞のコントロール培養系に抗-MK抗体を加えたところ、細胞のPA活性レベルが減少し、PAI-1の活性レベルは増加した。そして抗-MK抗体の存在下、レチノールのPA活性増強活性は50%まで落ち、一方PAI-1活性レベルは2倍に増加したことから、MKが血管内皮細胞から生産され、その生産がレチノールによって増強されることが示唆された。

【0024】これらの知見は、MK、PTN等MKファミリーポリペプチドあるいはその断片ペプチドが、レチノール等とは異なり、PAを選択的に生産・誘導させる薬物であることを示し、レチノールの如き、高用量投与により人体に様々な副作用を発現させる薬物とは異なり、使い易く安全な薬物として、人体にまた長期にわたって適応することが期待される。

【0025】本発明のポリペプチドあるいはその断片ペプチド、又はそれらと同様の生理活性を有するそれらの類似体を有効成分として医薬組成物を調製し、心筋梗塞、血栓、血管狭窄、血流不全、動脈硬化症等の予防・治療剤として用いる際、ポリペプチドあるいは断片ペプチドの原末そのもののみを投与することもできるが、薬剤として使用可能な生理食塩水、アルブミン、ゼラチン、デキストリン、デキストロース、グルコース、マン

ニトール、キシリトール、ガラクトース、マンノース、フラクトース、マルトース、サッカロース、ソルビトール、乳糖、蔗糖、などの糖類、デキストラン硫酸、コンドロイチン硫酸、ヘパリン、アミノ酸、有機酸、Tween 80などのポリソルベート系の非イオン界面活性剤、脂肪酸アルコールエステル、ポリグルコールエーテル等の担体と混合して投与することもできる。

【0026】更に、本発明の医薬用組成物は、製薬的に許容される担体等の添加剤として、上記の例示物の他に、充填剤、結合剤、滑沢剤、湿潤剤、崩壊剤、乳濁および懸濁液、保存剤、希釈剤、甘味剤、あるいは芳香剤等として作用する各種物質を含有し得る。

【0027】これらの添加剤の例としては、とうもろこし澱粉、結晶セルロース、アラビアゴム、リン酸カルシウム、アルジネート、ケイ酸カルシウム、微結晶セルロース、ポリビニルピロリドン、トラガカントゴム、ゼラチン、シロップ、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、メチルヒドロキシ安息香酸エステル、プロピルヒドロキシ安息香酸エステル、タルク、ステアリン酸マグネシウム、不活性なポリマー類、水及び鉱油等が挙げられる。

【0028】なお、本発明の医薬組成物は、投与の後の活性成分の放出速度が所望に応じて制御されるように処方しても良い。

【0029】これら医薬組成物は、任意の投与方法、たとえば経口投与、あるいは静脈内投与、筋肉内投与、皮下投与、直腸内投与、鼻内投与、舌下投与、局所投与などによって投与することができる。

【0030】本発明の医薬組成物の投与量は、患者の年齢、疾患の状態、程度、体重、投与経路などによって異なるが、一般的には0.001~50mg/kgの範囲にあり、一日あたり1回ないし数回、bolusにあるいは点滴などにより連続的に投与される。

【0031】また、本発明のポリペプチドあるいは断片ペプチドはt-PA、u-PAあるいはストレプトキナーゼなどの血栓溶解剤と同時に、あるいは時差をおいて又は交互に間隔をおいて併用投与することができる。

【0032】本発明の医薬組成物に有効成分として使用されるポリペプチドあるいは断片ペプチドは、遺伝子組換え技術あるいは全化学合成法または一部酵素合成法を併用した合成法によって調製できる。

【0033】以下本発明を実施例、参考例、実験例をもって、更に具体的に説明するが、もとより本発明はこれら記載に限られるものではない。

【実施例1】MK100mg、コンドロイチン硫酸ナトリウム10mg、乳糖500mgを5mMリン酸緩衝液(pH7.0)25mlに溶解し、濾過滅菌して得た溶液を2.5mlずつバイアルビンに充填した。これを凍結乾燥してミッドカイン製剤を製造した。

【実施例2】C-half(60-121)MKを実施

例1のMKのかわりに用いる他は実施例1と同様に行った。

〔実施例3〕C-half (62-104) MKを実施例1のMKのかわりに用いる他は実施例1と同様に行った。

〔実施例4〕N-half (1-59) MKを実施例1のMKのかわりに用いる他は実施例1と同様に行った。

〔実施例5〕C-half (67-136) PTNを実施例1のMKのかわりに用いる他は実施例1と同様に行った。

〔実施例6〕C-half (67-109) PTNを実施例1のMKのかわりに用いる他は実施例1と同様に行った。

〔実施例7〕N-half (1-66) PTNを実施例1のMKのかわりに用いる他は実施例1と同様に行った。

〔実施例8〕C-half (62-104) MK 100 mg および t-PA 50 mg を実施例1のMK 100 mg のかわりに用いる他は実施例1と同様に行った。

〔実施例9〕ヘパリン1 mg を実施例1のコンドロイチン硫酸ナトリウム10 mg のかわりに用いる他は実施例1と同様に行なった。

〔実施例10〕ヘパリン1 mg を実施例2のコンドロイチン硫酸ナトリウム10 mg のかわりに用いる他は実施例2と同様に行なった。

〔実施例11〕ヘパリン1 mg を実施例3のコンドロイチン硫酸ナトリウム10 mg のかわりに用いる他は実施例3と同様に行なった。

〔実施例12〕ヘパリン1 mg を実施例4のコンドロイチン硫酸ナトリウム10 mg のかわりに用いる他は実施例4と同様に行なった。

【0034】参考例としてC-half MKなどの合成法、物性を簡単に示す。

#### 参考例1

##### ヒト型h-Midkineの合成

保護ペプチド(1-121)の合成はアミノ酸121個からなるペプチドを液相法にて図1および図2に示すように、13個のフラグメント(1-11)(12-22)(23-31)(32-40)(41-51)(52-59)(60-70)(71-77)(78-83)(84-93)(94-103)(104-112)(113-121)に分割、合成した。各フラグメントの純度はTLC, HPLC, アミノ酸分析により確認した。この後N-half (1-59) [hMK-Nと略す。]とC-half (60-121) [hMK-Cと略す。]を合成するべくそれぞれC末から順次縮合した。各フラグメントの合成およびフラグメント縮合には全てWSC I/HOBt法またはWSC I/HOObt法を用いた。(WSC I: 1-ethyl-3, (3-dimethylaminopropyl)-carb

odiimide, HOBt: 1-hydroxybenzotriazole, HOObt: 3, 4-dihydro-3-hydroxy-4-oxo-1, 2, 3-benzotriazine)。アミノ酸のN末はBoc基で保護し、アミノ酸側鎖保護基にはそれぞれAsp(OcHex), Glu(OcHex), Ser(Bzl), Thr(Bzl), Lys(ClZ), Arg(Tos), Tyr(BrZ), Trp(For), そしてCysの保護基にはAcm基を用いた。その他C末保護基にはBzl基、各フラグメントのC末にはPac基を用いて合成した。(CHex: cyclohexyl), (Bzl: benzyl), (ClZ: z-chlorobenzoyloxycarbonyl), (Tos: tosyl), (BrZ: 2-bromobenzoyloxycarbonyl), For(formyl), Acm(acetamidomethyl), (Pac: Phenacyl ester)。

【0035】保護ペプチド(1-121) 3 gをHigh-HF (HF/Anisol=9/1, 0~5℃, 1h) で次いでLow-HF (HF/Butanediol=7/3, 0~5℃, 30min) で処理し1.9 gの粗製品を得た。この粗製品1.9 gをHPLC逆相クロマトグラフィー(YMC-ODSカラム、30X250mm) で分取した。溶離液には0.1% TFAを含むCH<sub>3</sub>CN溶液と0.1% TFA水を用い、CH<sub>3</sub>CN濃度10%から60%までの110分単一濃度勾配法、流速20ml/min、カラム温度は室温で溶出した。CH<sub>3</sub>CN濃度30-32.2%の画分を集め、減圧濃縮後凍結乾燥して420 mgのペプチドを得た。この420 mgのペプチドをCMセルロースのイオン交換クロマトグラフィー(3.7x17cm) に注入しstarting buffer 0.2M AcONH<sub>4</sub>+3M Urea (pH5), limiting buffer 0.7M AcONH<sub>4</sub>+3M Urea (pH6) 各1.25 Lの単一濃度勾配条件で溶出した。15 gずつ分画し0.48-0.53 M塩濃度画分(56本目から65本目)を集め溶液のpHを酢酸で下げ、そのまま逆相カラム(YMC-ODS, 30X250mm) に注入した。前述同様溶離液には0.1% TFAを含むCH<sub>3</sub>CN溶液と0.1% TFA水を用い、CH<sub>3</sub>CN濃度14%から44%までの110分単一濃度勾配法、流速20ml/min、カラム温度は室温で溶出した。CH<sub>3</sub>CN濃度28.5-29.2%の画分を集め、減圧濃縮後凍結乾燥して125 mgの10Acmペプチドを得た。

【0036】このうち90 mgを0.5 mMペプチド濃度になるように50% AcOHで溶かし、暗所でAcm基に対して1.1当量のHg(OAc)<sub>2</sub>を加え窒素雰囲気下室温で2時間かき混ぜた。その後Acm基に対し

て30当量の2-Mercaptoethanolを加えさらに2時間かき混ぜた。反応液をG-25のゲルろ過クロマトグラム(1.15x73cm)に注入し、5%AcOHで溶出した後ペプチドの部分を集め凍結乾燥してSHペプチド65mgを得た。

【0037】SHペプチド45mg(3.4μM)を1mMEDTAと2M(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>およびGSH/GSSG(100/10)を含んだ50mMAcONH<sub>4</sub>(pH7.7)の緩衝液、3.4L(1x10<sup>-5</sup>MConc.)に溶かし5℃で4日間かき混ぜた。TFAでpHを3とした後、逆相のカラム(YMC-C4, 20x250mm)に注入し、HPLC逆相クロマトグラフィー(YMC-ODSカラム、30X250mm)で分取した。溶離液には0.1%TFAを含むCH<sub>3</sub>CN溶液と0.1%TFA水を用い、CH<sub>3</sub>CN濃度15%から35%までの120分単一濃度勾配法、流速20ml/min、カラム温度は室温で溶出した。CH<sub>3</sub>CN濃度29.4-29.8%の画分を集め減圧濃縮後凍結乾燥して5mgのペプチドを得た。

【0038】SS結合架橋様式は、トリプシン消化後逆相HPLCで分取した各ピークについて質量分析およびアミノ酸分析により、天然型と同じであることを確認した。最終品の純度に関して逆相HPLCのみならずキャピラリー電気泳動の検査でもシングルピークを与えた。またアミノ酸分析値および質量分析値も理論値と良く一致した。hMKはODSカラム(4.6x150mm)で溶離液に0.1%TFAを含むCH<sub>3</sub>CN溶液と0.1%TFA水を用い、CH<sub>3</sub>CN濃度10%から40%までの25分単一濃度勾配法、流速1ml/min、カラム温度は50℃で溶出すると14.3minに溶出した。

質量分析値; 13241.2 [M<sup>+</sup>H]

アミノ酸分析値; Asp 7.52 (8), Thr 9.51 (10), Ser 2.86 (3), Glu 11.12 (11), Gly 16.00 (16), Ala 10.73 (10), Cys 9.17 (10), Val 4.87 (5), Ile 1.83 (2), Leu 1.02 (1), Tyr 2.01 (2), Phe 3.01 (3), Lys 23.32 (23), Trp 3.86 (4), Arg 6.90 (7), Pro 5.98 (6)

#### 参考例2

hMK-N (N-half) の合成

hMK同様保護ペプチド500mgをHigh-HF、およびLow-HF処理し粗製品340mgを得た。340mg全量をCMセルロースのイオン交換クロマトグラフィー(1.3x9.5cm)に注入し、starting buffer 0.2MAcONH<sub>4</sub>(pH5), limiting buffer 1.0MAcONH<sub>4</sub>(pH6)各600mlの単一濃度勾配条件で溶出した。15gずつ分画し0.34-0.38M塩濃度画分

(14本目から18本目)を集め溶液のpHをTFAで下げそのまま逆相カラム(YMC-ODS, 30X250mm)に注入した。0.1%TFAを含むCH<sub>3</sub>CN溶液と0.1%TFA水を用い、CH<sub>3</sub>CN濃度15%から45%までの110分単一濃度勾配法、流速20ml/min、カラム温度は室温で溶出した。CH<sub>3</sub>CN濃度28.1-28.9%の画分を集め減圧濃縮後、凍結乾燥して70mgの6AcMペプチドを得た。

【0039】hMK同様AcMペプチド50mgを50%AcOHで0.5mMペプチド濃度になるように溶かし、暗所でAcM基に対して1.1当量のHg(OAc)<sub>2</sub>を加え窒素雰囲気下室温で2時間、その後AcM基に対して30当量の2-Mercaptoethanolを加えさらに2時間かき混ぜ、G-25のゲルろ過クロマトグラフィー(1.15x73cm, 5%AcOHで溶出)後ペプチドの部分を集め凍結乾燥してSHペプチド40mgを得た。

【0040】SHペプチド40mg(6.18μM)を、1mMEDTAと2M(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>およびGSH/GSSG(100/10)を含んだ50mMAcONH<sub>4</sub>(pH7.7)の緩衝液618ml(1x10<sup>-5</sup>MConc.)に溶かし室温で一晩かき混ぜた。TFAでpHを3とした後逆相のカラムHPLC逆相クロマトグラフィー(YMC-ODSカラム、30X250mm)で分取した。溶離液には0.1%TFAを含むCH<sub>3</sub>CN溶液と0.1%TFA水を用い、CH<sub>3</sub>CN濃度10%から40%までの120分単一濃度勾配法、流速20ml/min、カラム温度は室温で溶出した。CH<sub>3</sub>CN濃度25.1-25.5%の画分を集め減圧濃縮後凍結乾燥してhMK-N15mgを得た。hMK-NはODSカラム(4.6x150mm)で溶離液に0.1%TFAを含むCH<sub>3</sub>CN溶液と0.1%TFA水を用い、CH<sub>3</sub>CN濃度10%から40%までの25分単一濃度勾配法、流速1ml/min、カラム温度は50℃で溶出すると13.9minに溶出した。純度およびSS結合架橋様式はhMKの検査に準じて行い、SS結合架橋様式が天然型と同じであり、逆相およびキャピラリー電気泳動でシングルピークであることを確認した。またアミノ酸分析値、質量分析値も理論値に良く一致した。

質量分析値; 6470.4 [M<sup>+</sup>H]

アミノ酸分析値; Asp 2.70 (3), Thr 2.88 (3), Ser 2.81 (3), Glu 6.08 (6), Gly 9.00 (9), Ala 3.16 (3), Cys 5.83 (6), Val 2.91 (3), Ile 0.94 (1), Phe 2.24 (2), Lys 9.26 (9), Trp 2.78 (3), Arg 4.00 (4), Pro 4.08 (4)

#### 参考例3

hMK-C (C-half) の合成

hMK同様保護ペプチド500mgをHigh-HFおよびLow-HF処理し粗製品340mgを得た。340mg全量をCMセルロースのイオン交換クロマトグラフィー(1.3x9.5cm)に注入し、starting buffer 0.2M AcONH<sub>4</sub>+3M Urea (pH5), limiting buffer 1.0M AcONH<sub>4</sub>+3M Urea (pH6) 各800mlの単一濃度勾配条件で溶出した。20gずつ分画し0.38-0.42M塩濃度画分(38本目から42本目)を集め、溶液のpHをTFAで下げそのまま逆相カラム(YMC-ODS, 30X250mm)に注入した。

0.1%TFAを含むCH<sub>3</sub>CN溶液と0.1%TFA水を用い、CH<sub>3</sub>CN濃度15%から25%までの60分単一濃度勾配法、流速20ml/min、カラム温度は室温で溶出した。CH<sub>3</sub>CN濃度22.0-24.5%の画分を集め減圧濃縮後、凍結乾燥して110mgの4Ac mペプチドを得た。

【0041】hMK同様Ac mペプチド110mgを50%AcOHで0.5mMペプチド濃度になるように溶かし、暗所でAc m基に対して1.1当量のHg(OAc)<sub>2</sub>を加え、窒素雰囲気下室温で2時間、その後Ac m基に対して30当量の2-Mercaptoethanolを加えさらに2時間かき混ぜ、G-25のゲルろ過クロマトグラフィー(1.15x73cm, 5%AcOHで溶出)後ペプチドの部分を集め凍結乾燥してSHペプチド65mgを得た。

【0042】SHペプチド65mg(9.6μM)を、1mM EDTAと2M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>およびGSH/GSSG(100/10)を含んだ50mM AcONH<sub>4</sub>(pH7.7)の緩衝液960ml(1x10<sup>-5</sup>M Conc.)に溶かし室温で一晩かき混ぜた。TFAでpHを3とした後逆相クロマトグラフィー(YMC-ODSカラム、30X250mm)で分取した。溶離液には0.1%TFAを含むCH<sub>3</sub>CN溶液と0.1%TFA水を用い、CH<sub>3</sub>CN濃度12%から22%までの60分単一濃度勾配法、流速20ml/min、カラム温度は室温で溶出した。CH<sub>3</sub>CN濃度25.1-25.5%の画分を集め減圧濃縮後、凍結乾燥して45mgのペプチドを得た。hMK-CはODSカラム(4.6x150mm)で溶離液に0.1%TFAを含むCH<sub>3</sub>CN溶液と0.1%TFA水を用い、CH<sub>3</sub>CN濃度10%から40%までの25分単一濃度勾配法、流速1ml/min、カラム温度は50℃で溶出すると13.5minに溶出した。純度およびSS結合架橋様式はhMKの検査に準じて行い、SS結合架橋様式が天然型と同じであり、逆相およびキャピラリー電気泳動でシングルピークであることを確認した。またアミノ酸分析値、質量分析値も理論値に良く一致した。

質量分析値; 6789.9 [M<sup>+</sup>H]

アミノ酸分析値; Asp 4.71(5), Thr 6.5

9(6), Glu 5.04(5), Gly 7.00(7), Ala 7.26(7), Cys 3.80(4), Val 1.97(2), Ile 0.88(1), Leu 0.96(1), Tyr 1.92(2), Phe 0.99(1), Lys 14.00(14), Trp 0.87(1), Arg 2.86(3), Pro 1.86(2)

#### 参考例4

hMK(62-104)(C-half)の合成

- 10 固相合成法(Boc strategy)で合成したhMK(62-104)樹脂(Cysの保護基に4MeBzlを用いた以外は同じ保護基を使用した。保護ペプチド樹脂1.7gをHF/p-Cresol/BDT=80/5/15で0-5℃, 1h処理し、得られた粗製品700mgを逆相クロマトグラフィー(YMC-ODSカラム、30X250mm)で分取した。溶離液には0.1%TFAを含むCH<sub>3</sub>CN溶液と0.1%TFA水を用い、CH<sub>3</sub>CN濃度15%から35%までの10分単一濃度勾配法、流速20ml/min、カラム温度は室温で溶出した。CH<sub>3</sub>CN濃度25.3-26.8%の画分を集め減圧濃縮後、凍結乾燥して60mgのSHペプチドを得た。

- 20 【0043】SHペプチド60mg(12.3μM)を、1mM EDTAと2M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>およびGSH/GSSG(100/10)を含んだ50mM AcONH<sub>4</sub>(pH7.7)の緩衝液1.23L(1x10<sup>-5</sup>M Conc.)に溶かし、室温で一晩かき混ぜた。TFAでpHを3とした後、逆相クロマトグラフィー(YMC-ODSカラム、30X250mm)で分取した。溶離液には0.1%TFAを含むCH<sub>3</sub>CN溶液と0.1%TFA水を用い、CH<sub>3</sub>CN濃度5%から40%までの60分単一濃度勾配法、流速20ml/min、カラム温度は室温で溶出した。

- 30 【0044】CH<sub>3</sub>CN濃度30.3-30.6%の画分を集め減圧濃縮後、凍結乾燥してhMK(62-104)30mgを得た。hMK(62-104)はODSカラム(4.6x150mm)で溶離液に0.1%TFAを含むCH<sub>3</sub>CN溶液と0.1%TFA水を用いCH<sub>3</sub>CN濃度1%から40%までの25分単一濃度勾配法、流速1ml/min、カラム温度は室温で溶出すると18.5minに溶出した。

- 40 【0045】純度およびSS結合架橋様式はhMKの検査に準じて行い、SS結合架橋様式が天然型と同じであり、逆相およびキャピラリー電気泳動でシングルピークであることを確認した。またアミノ酸分析値、質量分析値も理論値に良く一致した。

質量分析値; 4836.2 [M<sup>+</sup>H]

アミノ酸分析値; Asp 2.70(3), Thr 4.62(5), Glu 5.22(5), Gly 4.93(5), Ala 3.17(3), Cys 3.49



13

(4), Val 1.96 (2), Ile 0.88  
(1), Leu 1.05 (1), Tyr 1.98  
(2), Phe 0.98 (1), Lys 6.11  
(6), Trp 0.86 (1), Arg 3.00  
(3), Pro 0.99 (1)

## 参考例5

hMK (104-121) の合成

hMKのフラグメント(104-112)と(113-121)を縮合させて合成した保護ペプチド100mgをHF/Anisol=9/1で0~-5℃, 1h処理し、得られた粗製品80mgを逆相クロマトグラフィー(YMC-ODSカラム、30X250mm)で分取した。溶離液には0.1%TFAを含むCH<sub>3</sub>CN溶液と0.1%TFA水を用い、CH<sub>3</sub>CN濃度3%から18%までの60分単一濃度勾配法、流速20ml/min、カラム温度は室温で溶出した。CH<sub>3</sub>CN濃度10.25-11.25%の画分を集め減圧濃縮後、凍結乾燥してhMK(104-121)60mgを得た。hMK(104-121)はODSカラム(4.6x150mm)で溶離液に0.1%TFAを含むCH<sub>3</sub>CN溶液と0.1%TFA水を用い、CH<sub>3</sub>CN濃度1%から40%までの25分単一濃度勾配法、流速1ml/min、カラム温度は室温で溶出すると10.9minに溶出した。純度に関して逆相HPLCでシングルピークであることを確認した。またアミノ酸分析値、質量分析値も理論値に良く一致した。

質量分析値; 1960.4 [M<sup>+</sup>H]

アミノ酸分析値; Asp 1.00 (1), Thr 2.00 (2), Gly 1.98 (2), Ala 3.01 (3), Cys 0.68 (1), Lys 8.06 (8), Pro 0.99 (1)

## 参考例6

ヒト型h-pleiotropin (67-109) の合成

固相合成法(Boc strategy)で合成したhPTN(67-109)樹脂(Cysの保護基に4MeBzl, Hisの保護基にBomを用いた以外は同じ保護基を使用した)1.5gにCys30当量を加え、HF/p-Cresol/BDT=80/5/15で0~-5℃, 1h処理し、得られた粗製品1.57g(Cysを含む)を逆相クロマトグラフィー(YMC-ODSカラム、30X250mm)で分取した。溶離液には0.1%TFAを含むCH<sub>3</sub>CN溶液と0.1%TFA水を用い、CH<sub>3</sub>CN濃度15%から35%までの100分単一濃度勾配法、流速20ml/min、カラム温度は室温で溶出した。CH<sub>3</sub>CN濃度24.5-25.6%の画分を集め、減圧濃縮後凍結乾燥してSHペプチド50mgを得た。

【0046】SHペプチド50mg(12.3μM)を、1mMEDTAと2M(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>およびGS

14

H/GSSG(100/10)を含んだ50mMAcONH<sub>4</sub>(pH7.7)の緩衝液1.23L(1x10<sup>-4</sup>MConc.)に溶かし室温で一晩かき混ぜた。TFAでpHを3とした後、逆相クロマトグラフィー(YMC-ODSカラム、30X250mm)で分取した。溶離液には0.1%TFAを含むCH<sub>3</sub>CN溶液と0.1%TFA水を用い、CH<sub>3</sub>CN濃度5%から40%までの60分単一濃度勾配法、流速20ml/min、カラム温度は室温で溶出した。

10 【0047】CH<sub>3</sub>CN濃度28.5-29.3%の画分を集め減圧濃縮後、凍結乾燥してhPTN(67-109)30mgを得た。hPTN(67-109)はODSカラム(4.6x150mm)で溶離液に0.1%TFAを含むCH<sub>3</sub>CN溶液と0.1%TFA水を用い、CH<sub>3</sub>CN濃度1%から40%までの25分単一濃度勾配法、流速1ml/min、カラム温度は室温で溶出すると17.3minに溶出した。

20 【0048】純度およびSS結合架橋様式はhMKの検査に準じて行い、SS結合架橋様式が天然型と同じであり、逆相およびキャピラリー電気泳動でシングルピークであることを確認した。またアミノ酸分析値、質量分析値も理論値に良く一致した。

質量分析値; 4840.5 [M<sup>+</sup>H]

アミノ酸分析値; Asp 2.98 (3), Thr 4.75 (5), Ser 1.87 (2), Glu 5.10 (5), Gly 2.00 (2), Ala 4.06 (4), Cys 3.60 (4), Val 0.97 (1), Ile 0.91 (1), Leu 3.95 (4), Tyr 0.96 (1), Phe 0.98 (1), His 0.97 (1), Lys 5.10 (5), Trp 0.85 (1), Arg 1.98 (2), Pro 0.97 (1)

【実験例1】細胞内PA活性測定

ウシ大動脈由来血管内皮細胞を10%ウシ血清(BSA)を含むαMEM内に分離し、培養した。96穴培養プレートに細胞をまきコンフルエントになるまで培養後、pH7.4のリン酸緩衝生理食液(PBS)で洗い、0.1%BSAを含む100μlの無血清αMEM(αMEM-BSA)中で培養を行った。

40 【0049】この100μlの培地中に種々の濃度のMKポリペプチドや断片ペプチドまた対照のレチノールを添加し、それら薬剤によるPA生産・誘導能を測定した。

【0050】各培養時間ごとに、培養上清をアスピレートし、培養細胞をPBSで洗い、細胞内PAを0.5%TritonX-100を含む0.1Mトリス-HCl(pH8.1)緩衝液100μl中に抽出し、抽出液中のPAレベルは<sup>125</sup>I-ラベルフィブリンプレート(Gross, J. L. et al., J. Cell Biol., 95, 974-981 (1982))を用いて

測定した。

【0051】PA活性はサンプル中のmgタンパクあたりのUK単位(U)で表わした。蛋白濃度はBSAを標準として、マイクロタイタープレートBCA(Pierce, Rockford, IL, USA)により測定した。18時間培養後、未添加の対照に対してレチノール2μMの添加で1.5倍のPA活性レベルとなった。レコンビナントMK、化学合成MK、C-half MKなどは10~100ng/mlの濃度で、対照に比べて、3倍から15倍のPA活性が見られた。他方MK自身はプラスミン活性を持たないことおよびプラスミノゲンを直接に活性化することはないことがわかった。

【実験例2】体重400g前後のSDラットを麻酔後、大腿動脈よりカテーテルを、左総頸動脈に挿入しバルーンを直径4mmほどふくらませ、総頸動脈を全長にわたり傷害した。

【0052】このラットにMKポリペプチドあるいはその断片ペプチドなどを、傷害の前後から連日投与し、バ \*

\* ルーン傷害後20日ないし100日に頸動脈を摘出し、組織の標本を作成し、血管の最大肥厚部の内膜/中膜の面積比を算出し、内膜肥厚度とした。

【0053】MKポリペプチドあるいはその断片ペプチドなどの投与群においては、対照の生食投与群のラットと比較して、内膜肥厚度が顕著に低く、MKポリペプチドあるいはその断片ペプチドなどが、PTCA後の血管再狭窄や再閉塞、再梗塞、動脈硬化などの予防に有効であろうことが示された。

10 【実験例3】MKポリペプチドあるいはその断片ペプチドなどの単回静脈投与毒性をラットを用いて調べた。MKポリペプチドあるいはその断片ペプチドなどの50mg/kg投与では、死亡するラットはいなかった。

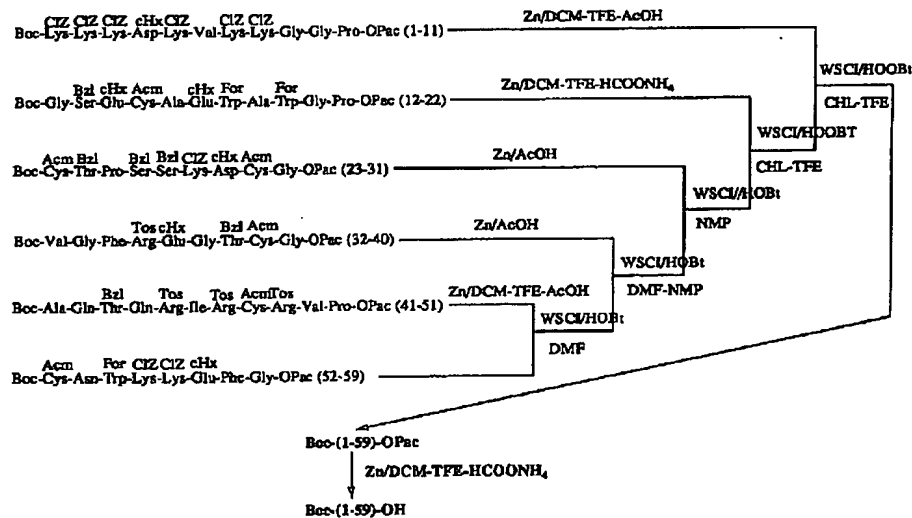
【図面の簡単な説明】

【図1】保護されたミッドカイン(1-59)の合成図

【図2】保護されたミッドカイン(60-121)の合成図

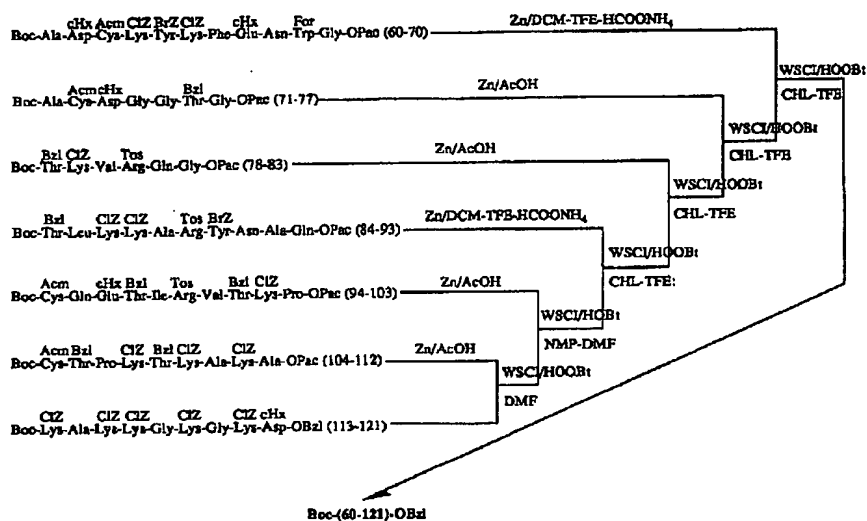
【図1】

保護されたミッドカイン(1-59)の合成



【図2】

保護されたミッドカイン (50-121) の合成



フロントページの続き

(51) Int. Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 38/00	A B X		A 6 1 K 37/02	A B S A B X
(72) 発明者 村松 寿子			(72) 発明者 ▲榊▼原 俊平	
愛知県名古屋市中天白区天白町大字島田字黒			大阪府吹田市藤白台2丁目23番3号	
石3785-3391シティコーポしまだB-205			(72) 発明者 木村 ▲皓▼俊	
(72) 発明者 栗屋 昭			兵庫県西宮市苦楽園二番丁10-6	
神奈川県横浜市戸塚区矢部町4978				